

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GÊNICOS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
ENDOTELIAL (Glu298Asp E T-786C) COM FATORES DE RISCO  
CARDIOVASCULARES E EVENTOS SIMULTÂNEOS DE INFARTO E HIPERTENSÃO

KARINA MARANGONI

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Fevereiro – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GÊNICOS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
ENDOTELIAL (Glu298Asp E T-786C) COM FATORES DE RISCO  
CARDIOVASCULARES E EVENTOS SIMULTÂNEOS DE INFARTO E HIPERTENSÃO

KARINA MARANGONI

Prof. Dr. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de Uberlândia, para  
a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

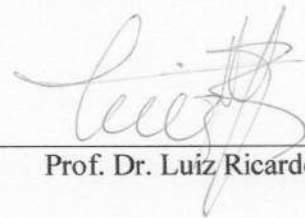
Uberlândia – MG  
Fevereiro – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

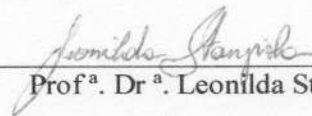
CORRELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GÊNICOS DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
ENDOTELIAL (Glu298Asp E T-786C) COM FATORES DE RISCO  
CARDIOVASCULARES E EVENTOS SIMULTÂNEOS DE INFARTO E HIPERTENSÃO

KARINA MARANGONI

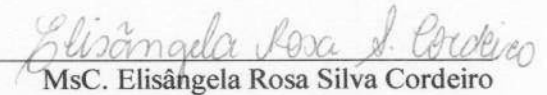
Aprovado pela Banca Examinadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nota \_\_\_



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho



Prof.ª Dr.ª Leonilda Stanziola Knychala



MsC. Elisângela Rosa Silva Cordeiro

Uberlândia, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2003.

# Correlação dos polimorfismos gênicos da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (Glu298Asp e T-786C) com fatores de risco cardiovasculares e eventos simultâneos de infarto e hipertensão

**Karina Marangoni**

*Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Genética Molecular, Uberlândia –MG, Brasil*

## Resumo

O óxido nítrico (NO) além de potente vasodilatador e inibidor da adesão e agregação plaquetária, reduz a aderência de leucócitos no endotélio. Estas funções do NO estão associadas à atividade da óxido nítrico sintase endotelial. Neste estudo objetivou-se correlacionar os polimorfismos gênicos do eNOS, Glu298Asp e T-786C, com fatores de risco cardiovasculares e eventos simultâneos de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e infarto agudo do miocárdio (IAM). Analisou-se 84 pacientes, 34 controles e 50 IAM/HAS. Para a genotipagem da variante Glu298Asp, utilizou-se o PCR-RFLP com a enzima Ban II. Para a variante T-786C, utilizou-se a técnica LIS-SSCP. Dos fatores de risco cardiovasculares apenas os altos níveis de colesterol total e LDL, e os baixos níveis de HDL apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,001$ ). Um novo alelo (A) no sítio polimórfico T-786C foi descoberto, gerando os genótipos, TA, AA e CA. Observou-se um aumento da frequência dos genótipos CC e CA nos pacientes IAM/HAS, sugerindo que estes pudessem estar contribuindo para a ocorrência do IAM e HAS. Para ambas as variantes polimórficas do eNOS, T-786C e Glu298Asp, verificou-se que os alelos mutantes, C/A e T, respectivamente, favorecem o acúmulo de colesterol total ( $>200\text{mg/dl}$ ), com OR significativo de 4,8 e 3,6 respectivamente.

*Palavras-chave:* óxido nítrico sintase endotelial, hipertensão arterial sistêmica, infarto agudo do miocárdio, polimorfismos

## Introdução

Depois da identificação do óxido nítrico (NO) como um importante fator vasodilatador associado ao endotélio vascular, novas pesquisas têm sido feitas buscando mais informações sobre sua fisiologia e patofisiologia (Moncada e Higgs, 1993). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas denominadas de NO sintase (NOS) que catalizam a oxidação da L-arginina para formar NO e L-citrulina (Konturek e Konturek, 1995; Moncada e Higgs, 1993). Três isoformas da NOS têm sido identificadas: duas constitutivas, a neural (nNOS; tipo I) se expressando no sistema nervoso central e periférico, bem

como na mácula densa (Moncada, 1992), e a endotelial (eNOS; tipo III) se expressando no endotélio, miócitos cardíacos, células mesangiais renais, osteoblastos e osteoclastos, e, em pequena quantidade, nas plaquetas (Rang e Dale, 1993); e uma induzível (iNOS; tipo II) se expressando nas paredes dos vasos e nos macrófagos (Moncada e Higgs, 1993).

O óxido nítrico (NO) além de ser um potente vasodilatador e inibidor da adesão e agregação plaquetária, reduz a aderência de leucócitos no endotélio vascular e, também, suprime a proliferação de células da musculatura lisa vascular por

inibição de fatores de crescimento (Cooke e Dzau, 1997).

O papel do NO na regulação do tônus vascular e da função plaquetária é atribuído à atividade da isoforma eNOS. A sua inativação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos e resulta num aumento do tônus vascular e da adesão e agregação plaquetária. A via de transdução de sinal que leva à ativação da eNOS é regulada pela formação do complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina e pela ligação contínua de vasodilatadores a seus receptores que se encontram na superfície da célula endotelial, e que promovem a ativação da via inositol trifosfato, desencadeando a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Wang e Marsden, 1995; Fleming e Busse, 1999). Qualquer disfunção que ocorra neste importante mecanismo poderá promover aterogênese pela exposição da parede arterial à efeitos vasoconstritores diretos, conduzindo à hipertensão (Miyamoto *et al.*, 1998; Shoji *et al.*, 2000) e ao infarto agudo do miocárdio (IAM) (Wang *et al.*, 1996).

Vários polimorfismos gênicos da eNOS têm sido relatados, comprovando que estes estão correlacionados com inúmeras doenças cardiovasculares. O gene da NOS endotelial está localizado no cromossomo 7q35-36 e é formado por 26 éxons apresentando um tamanho total de 21Kb (Janssens *et al.*, 1992; Marsden *et al.*, 1993). Duas variantes diferentes no gene da eNOS apresentam associação significativa com a hipertensão arterial e infarto agudo do miocárdio. Estas estão apoiadas em duas diferentes substituições de bases, caracterizando os polimorfismos Glu298Asp e T<sup>-786</sup>→C.

Hibi *et al.* (1998), executaram estudos no loco da NOS endotelial e encontraram uma significativa associação entre os homozigotos mutantes (TT) para o polimorfismo Glu298Asp e a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM). O polimorfismo Glu298Asp situado no éxon sete do gene da eNOS é caracterizado pela

transição de G→T na posição do nucleotídeo 1917, resultando na conversão de ácido glutâmico para ácido aspártico no códon 298. Esta variante está associada não só ao infarto do miocárdio, mas também ao espasmo coronário (Yasue *et al.*, 1995 e Shimasaki *et al.*, 1998) e a hipertensão (Miyamoto *et al.*, 1998).

O polimorfismo T<sup>-786</sup>→C localizado na região promotora do gene da NOS endotelial é caracterizado pela transição de T→C na posição do nucleotídeo -786. Técnicas utilizadas para analisar a expressão gênica da eNOS revelaram que este polimorfismo reprimi a transcrição do gene NOS endotelial. Assim, resultados recentes sugerem uma forte evidência de que a presença do alelo mutante (C) no gene da eNOS, reduz a produção endotelial de NO nas artérias coronárias e predispõe os pacientes que carregam esse alelo mutante ao espasmo coronário (Nakayama *et al.*, 1999) e hipertensão (Hyndman *et al.*, 2002).

Este trabalho tem como objetivo correlacionar os polimorfismos gênicos do eNOS, Glu298Asp e T-786C, com fatores de risco cardiovasculares e eventos simultâneos de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e infarto agudo do miocárdio (IAM).

## Material e Métodos

### Grupo de Estudo

Para a genotipagem dos polimorfismos Glu298Asp e T<sup>-786</sup>→C do gene da eNOS foram elegíveis 50 indivíduos (25 homens e 25 mulheres; com idade média de 60,3 anos) com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (IAM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS). O grupo de infartados enquadrou-se na definição da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1979) para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio, com base na presença de, pelo menos, dois dos três critérios: 1- história clínica de dor torácica

típica de isquemia; 2- alterações do segmento ST, supra e infradesnívelamento, em eletrocardiogramas seriados; 3- elevação dos níveis séricos de marcadores cardíacos, sendo a enzima creatinofosfoquinase (CK-MB) o teste laboratorial utilizado, segundo Ryan *et al.* (1996).

A hipertensão arterial sistêmica foi diagnosticada em indivíduos que mantiveram uma PA sistólica maior que 140 mmHg e PA diastólica maior que 90 mmHg. O grupo controle foi constituído de 34 indivíduos (15 homens, 19 mulheres; com idade média de 50,8 anos) hígidos, sem evidências de coronariopatias.

### **Material Biológico**

O material biológico foi fornecido pelo Setor de Hemodinâmica e Cardiologia Intervencionista do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Instituto do Coração, mediante uma autorização prévia do paciente pelo termo de consentimento informado. As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos, por sistema de Vacutainer, contendo EDTA para evitar coagulação, e posteriormente foram levadas ao Laboratório de Genética Molecular, da Universidade Federal de Uberlândia. A extração do DNA foi feita segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1990).

### **Genotipagem do Polimorfismo Glu298Asp da gene do NOS endotelial**

Para a detecção do polimorfismo Glu298Asp, parte do gene eNOS contendo o éxon sete foi amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os primers 5'- TCC CTG AGG AGG GCA TGA GGC T- 3' e 5'- TGA GGG TCA CAC AGG TTC CT- 3' descritos por Hibi *et al.* (1998). O DNA foi amplificado em um termociclador MJ. Research, Inc. por 35 ciclos, consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto, e

extensão a 72°C por 1 minuto. O produto amplificado de 457-pb foi visualizado em gel de agarose 1,5% aplicando-se 3µl de Tampão de Carreamento (LOAD) e 8µl de amostra, utilizou-se um marcador de 50pb. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado por meio do aparelho VDS da Pharmacia Biotech. Posteriormente o produto amplificado foi incubado a 37°C por no mínimo 20 horas, com 4U da enzima de restrição BanII (Qbiogene).

O fragmento amplificado foi digerido em fragmentos de 137 e 320 pb. Se houver a transição de G para T na posição 1917 do gene da NOS endotelial, a BanII perde seu sítio de restrição. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2,5%, aplicando-se 3µl de tampão de carreamento (load) e 10µl de amostra, utilizando-se um marcador de 50pb. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado por meio do aparelho VDS da Pharmacia Biotech.

### **Genotipagem do Polimorfismo T-786C do gene da NOS endotelial**

Para a detecção do polimorfismo T-786C a região promotora do gene do NOS endotelial foi amplificada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os primers 5'- ATG CTC CCA CCA GGG CAT CA - 3' e 5'- GTC CTT GAG TCT GAC ATT AGG G - 3' descritos por Nakayama *et al.* (1999). O DNA foi amplificado em um termociclador MJ. Research, Inc. por 35 ciclos, consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto. O produto amplificado de 236-pb foi visualizado em gel de agarose 1,5% aplicando-se 3µl de tampão de carreamento (load) e 8µl de amostra, utilizando-se um marcador de 50pb. O gel foi corado e fotografado como descrito anteriormente.

A técnica da conformação polimórfica de fita simples em baixa concentração iônica (LIS-SSCP) inicialmente descrito por Maruya *et al.*

(1996), foi utilizada para a obtenção de um padrão de genotipagem para esta variante. Utilizou-se um gel de poliacrilamida 15% (49:1 Acrilamida: Bisacrilamida) nas dimensões 15:15:0,5cm. Foram adicionados 20µl de Tampão de LIS (Sacarose 10%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xilenocianol 0,01%) e 3,5µl de produto amplificado. As misturas foram incubadas por 10 minutos a 97°C e posteriormente, foram aplicados 12µl de cada mistura no gel. O tampão utilizado foi TBE 1X, e a corrida teve duração de 20 horas, a 200 volts em temperatura ambiente. Logo após o término da eletroforese, o gel foi corado em nitrato de prata de acordo com Blum *et al.* (1987), com modificações de Bassam *et al.* (1991).

#### Dados laboratoriais

Os fatores de risco cardiovasculares que estão classicamente estabelecidos foram documentados nos dois grupos de pacientes tais como: níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL, níveis baixos de colesterol HDL e níveis elevados de triglicérides. De acordo com o II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias (1996), o colesterol total maior que 200 mg/dl, em jejum de 12 horas, define um quadro de hipercolesterolemia, níveis altos de colesterol LDL equivale a valores acima de 159 mg/dl, níveis baixos de colesterol HDL equivale a valores menores que 35 mg/dl, e triglicérides maior que 200 mg/dl define um quadro de hipertrigliceridemia.

#### Análise estatística

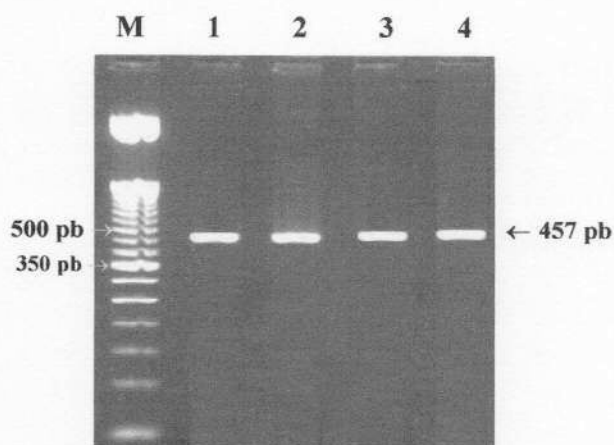
As médias de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides e proporção masculino/feminino entre os grupos, foram comparadas pelo teste *t* para amostras independentes. Foram também realizados cálculo do "odds ratio" e os testes do qui-quadrado para comparação das frequências gênicas e genotípicas. Para as demais análises, utilizou-se a estatística descritiva, devido ao pequeno valor amostral de ambos os grupos.

## Resultados

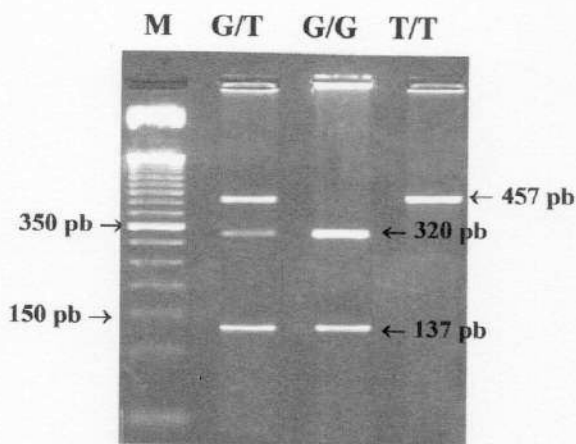
### Genotipagem

#### Polimorfismo Glu298Asp

A figura 1 demonstra os resultados obtidos através da amplificação pela técnica de PCR, com visualização em gel de agarose 1,5%. Pelo marcador de 50 pb utilizado, é possível observar a presença do fragmento esperado de 457 pb. Para obter um padrão de genotipagem para a variante Glu298Asp, foi necessário a restrição enzimática com a enzima Ban II. A figura 2 demonstra o padrão de genotipagem obtido em gel de agarose 2,5%. Indivíduos homocigotos mutantes (TT) apresentaram apenas uma banda de 457 pb, pois perderam o sítio de restrição para esta enzima. Indivíduos heterocigotos (GT) apresentaram três bandas (137, 320 e 457 pb) e indivíduos homocigotos normais (GG) apresentaram duas bandas (137 e 320 pb).



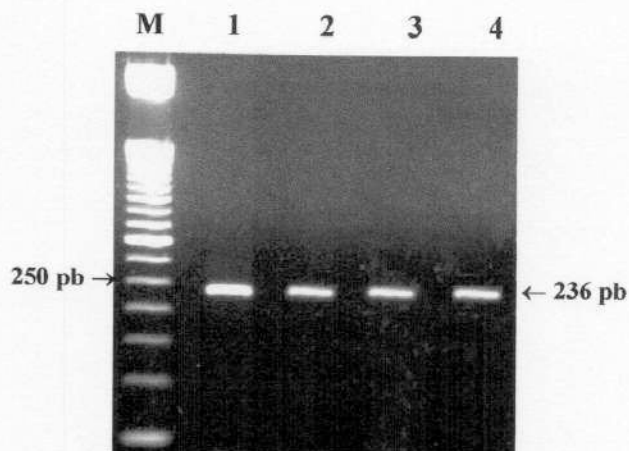
**Figura 1.** Gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação do fragmento de 457pb do gene da Óxido Nítrico Sintase Endotelial. Coluna 1: marcador de 50 pb. Colunas 1 – 4: fragmentos de 457 pb.



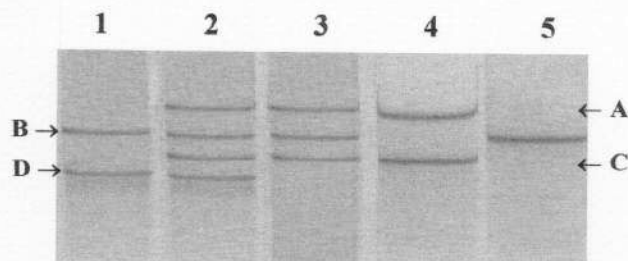
**Figura 2.** Gel de agarose 2,5% evidenciando o padrão de genotipagem para o polimorfismo Glu298Asp da NOS endotelial. Coluna M: marcador de 50 pb. O homozigoto para o alelo Glu298 está na coluna G/G, o homozigoto para o alelo Asp298 está na coluna T/T e o heterozigoto está na coluna G/T.

#### Polimorfismo T-786C

A figura 3 demonstra os resultados obtidos através da amplificação pela técnica de PCR, com visualização em gel de agarose 1,5%. Pelo marcador de 50pb utilizado, é possível observar a presença do fragmento esperado de 236pb. Para obter um padrão de genotipagem para esta variante, foi necessário a otimização da técnica de LIS-SSCP (conformação polimórfica de fita simples em baixa concentração iônica). A figura 4 demonstra o padrão de genotipagem obtido em gel de poliacrilamida 15%. Os indivíduos heterozigotos CA apresentaram duas bandas (B e D) e os CC apenas uma banda (B). Os indivíduos heterozigotos TC apresentaram três bandas (A, B e C) e os TA apresentaram 4 bandas (A, B, C e D). Os indivíduos homozigotos normais TT apresentaram duas bandas (A e C).



**Figura 3.** Gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação do fragmento de 236pb do gene do Óxido Nítrico Sintase Endotelial. Coluna 1: marcador de 50 pb. Colunas 1 – 4: fragmentos de 236 pb.



**Figura 4.** Gel de poliacrilamida 15% evidenciando o padrão de genotipagem obtido pela técnica de LIS-SSCP. Indivíduo heterozigoto CA (coluna 1) caracterizado pelas bandas B e D. Indivíduo heterozigoto TA (coluna 2) caracterizado pelas bandas A, B, C e D. Indivíduo heterozigoto TC (coluna 3) caracterizado pelas bandas A, B, C. Indivíduo normal TT (coluna 4) caracterizado pela bandas A e C. Indivíduo mutante CC (coluna 5) caracterizado pela banda B.

#### Características clínicas do grupo controle e dos pacientes com IAM/HAS

A tabela 1 compara as características clínicas entre os dois grupos de estudo. Pelo fato de termos selecionados pacientes controle que se igualassem em gênero ao grupo de pacientes IAM/HAS, esta variável não se mostrou diferente entre os grupos (P=



0.596). Os níveis de colesterol total se mostraram significativamente elevados nos pacientes IAM/HAS (P= 0,011), enquanto que os níveis de colesterol LDL e HDL foram significativamente elevados no grupo controle (P=0,002 e P= 0,004). Os níveis de triglicérides não foram significativamente diferente entre os grupos (P= 0,339).

**Tabela 1.** Características clínicas dos pacientes em estudo

Características	Pacientes IAM/HAS (n=50)	Controle (n= 34)	P
**M/F	25/25	15/19	0,596
Colesterol, mg/dl	219,1 ± 42,9	197,2 ± 29,1	*0,011
HDL, mg/dl	44,3 ± 7,7	49,5 ± 8,0	*0,004
Triglicérides, mg/dl	163,6 ± 53,7	181,7 ± 116,3	0,339
LDL, mg/dl	109,9 ± 28,1	131,4 ± 30,7	*0,002

\*P<0,05. A análise pelo teste *t* foi usada para avaliar algumas frequências de valores fenotípicos

\*\* sexo masculino e feminino (M/F)

### Distribuição das frequências genotípicas e alélicas das variantes do gene eNOS em pacientes com IAM/HAS e no grupo controle

#### Polimorfismo Glu298Asp

Um total de 50 pacientes com IAM/HAS e 34 pacientes controles foram envolvidos neste estudo. As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo nos pacientes com IAM/HAS e no grupo controle estão representadas na tabela 2. As frequências genotípicas e alélicas foram similares nos dois grupos de estudo. Quando assumiu-se o modelo dominante de herança (GG versus GT + TT), a frequência dos genótipos GT e TT também não se mostrou diferente entre os grupos de estudo.

**Tabela 2.** Frequências genotípicas e alélicas da variante Glu298Asp

Genótipos e alelos	Controle (n= 34)	Pacientes IAM/HAS (n= 50)
<b>Genótipos</b>		
GG	10 (29,4%)	15 (30%)
GT	21 (61,8%)	30 (60%)
TT	3 (8,8%)	5 (10%)
<b>Modelo dominante</b>		
GG	10 (29,4%)	15 (30%)
GT + TT	24 (70,6%)	35 (70%)
<b>Alelos</b>		
G (Glu)	0,6	0,6
T (Asp)	0,4	0,4

#### Polimorfismo T-786C

A presença de um novo alelo na região promotora do gene da eNOS foi detectado durante a genotipagem deste polimorfismo, gerando 3 novos genótipos CA, TA (Figura 5, colunas 1 e 2 respectivamente) e AA, que não foi genotipado em nenhum paciente. A tabela 3 compara as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo T-786C nos dois grupos de estudo. Nos pacientes IAM/HAS as frequências dos genótipos CA + CC (12%) e dos homocigotos normais TT (40%) se mostraram elevadas quando comparadas ao grupo controle, já os heterocigotos TC + TA possuem uma maior frequência no grupo controle. A frequência do alelo T é similar nos dois grupos. O alelo C possui sua frequência aumentada (0,28) no grupo controle enquanto que a frequência do alelo A se mostra um pouco maior (0,13) nos pacientes IAM/HAS.

**Tabela 3.** Frequências genotípicas e alélicas da variante T-786C

Genótipos e alelos	Controle (n= 34)	Pacientes IAM/HAS (n= 50)
<b>Genótipos</b>		
TT	10 (29,4%)	20 (40%)
TC+TA	23 (67,7%)	24 (48%)
CC+CA	1 (2,9%)	6 (12%)
<b>Alelos</b>		
T	0,63	0,64
C	0,28	0,23
A	0,09	0,13

\*\* Odds ratio (CC/CA x TT/TC/TA) = 4,5 (IC 95% = 0,5166-39,2009).

## Relação dos níveis de colesterol total com os genótipos

### Polimorfismo Glu298Asp

Um total de 84 pacientes (controle + pacientes IAM/HAS) foram envolvidos nesta análise, 32 pacientes com o colesterol total abaixo do valor de referência 200 mg/dl (II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias, 1996) e 52 com o colesterol total acima de 200 mg/dl (Tabela 4). Dos pacientes com o genótipo GG, 64,0% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 36,0% colesterol > que 200 mg/dl. Dos pacientes com o genótipo GT, 29,40% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 70,6% colesterol > que 200 mg/dl. Dos pacientes com o genótipo TT, 12,5% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 87,5% colesterol > que 200 mg/dl. A frequência dos homozigotos mutantes e dos heterozigotos nos pacientes com o colesterol total acima de 200 mg/dl foi significativamente mais elevada que nos pacientes com o colesterol total até 200 mg/dl ( $P < 0,05$ ). Deste modo, fica evidente a contribuição dos genótipos GT e TT para o aumento do colesterol total nos pacientes (controle + IAM/HAS).

**Tabela 4.** Relação dos níveis de colesterol total com os genótipos da variante Glu298Asp

Genótipo	N	Colest. 0	Colest. 1
GG	25	16 (64,0%)	9 (36,0%)
GT	51	15 (29,4%)	36 (70,6%)
TT	8	1 (12,5%)	7 (87,5%)
Total	84	32	52

Colest 0= colesterol < que 200 mg/dl

Colest 1= colesterol > que 200 mg/dl

$X^2 = 5,20$  (gl= 2)  $P < 0,05$

### Polimorfismo T-786C

A tabela 5 compara os genótipos dos 84 pacientes (controle + IAM/HAS) em relação ao nível de colesterol total. Foram analisados 34 pacientes com o colesterol total abaixo de 200 mg/dl e 50 pacientes com o colesterol acima de 200 mg/dl. Dos pacientes com o genótipo TT, 60,0% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 40,0% colesterol > que 200 mg/dl.

Dos pacientes com os genótipos TC/TA 31,9% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 68,1% colesterol > que 200 mg/dl. Dos pacientes com os genótipos CC/CA 14,3% apresentaram colesterol < que 200 mg/dl e 85,7% colesterol > que 200 mg/dl. A frequência dos homozigotos mutantes e dos heterozigotos nos pacientes com colesterol acima de 200 mg/dl foi significativamente mais elevada que nos pacientes com o colesterol total até 200 mg/dl ( $P < 0,05$ ). Assim, fica evidente a contribuição dos genótipos TC, TA, CC e CA para o aumento do colesterol total nos pacientes (controle + IAM/HAS).

**Tabela 5.** Relação dos níveis de colesterol total com os genótipos da variante T-786C

Genótipo	N	Colest. 0	Colest. 1
TT	30	18 (60,0%)	12 (40,0%)
TC/TA	47	15 (31,9%)	32 (68,1%)
CC/CA	7	1 (14,3%)	6 (85,7%)
Total	84	34	50

Colest 0= colesterol < que 200 mg/dl

Colest 1= colesterol > que 200 mg/dl

$X^2 = 4,04$  (gl= 2)  $P < 0,05$

## Discussão

A presença de um novo alelo no sítio polimórfico T-786C foi a grande descoberta desta pesquisa. Por saber que alelo é uma das formas alternativas de um gene dentro de um único loco, é que foi possível afirmar a existência do alelo A. Observando-se os perfis de bandas dos outros genótipos TC, TT e CC, (figura 5: colunas 3, 4 e 5 respectivamente) já relatados por Nakayama *et al.* (1999), reconheceu-se a associação dos alelos T e C com o novo alelo A. Este é o primeiro trabalho que relata a existência deste novo alelo, gerando 3 novos genótipos que denominamos CA, TA (figura 5: colunas 1 e 2 respectivamente) e AA, que apesar da sua existência não foi genotipado em nenhum paciente. Nakayama *et al.* (1999), sugeriu que a presença do alelo mutante C da variante T-786C do gene do eNOS,

reduziria a produção do NO nas artérias coronárias, predispondo os pacientes que carregam esse alelo mutante ao espasmo coronário e HAS (Hyndman *et al.*, 2002).

O presente estudo revelou um aumento da frequência dos genótipos CC e CA nos pacientes com IAM/HAS, sugerindo desta forma, que eles pudessem estar contribuindo para a ocorrência do IAM e HAS. Apesar de não significativo o "odds ratio" entre CC/CA x TT/TC/TA foi de 4,5 (IC 95% - 0,5166-39,2009), mostrando-se razoavelmente elevado. A tendência aumentada para o risco de IAM/HAS, embora não significativa pode ser devido à pequena amostragem de pacientes. Provavelmente uma maior amostra poderá trazer resultados mais significativos.

Segundo Feron *et al.* (1999) e Peterson *et al.* (1999) a hipercolesterolemia (colesterol total acima de 200 mg/dl) é um fator central de disfunção endotelial causada, em parte, por um defeito na produção de NO através de mecanismos que permanecem pobremente caracterizados. A atividade da eNOS foi recentemente demonstrada como modulada pela sua interação recíproca com o estimulador complexo cálcio-calmodulina e o inibidor proteína caveolina.

A hipercolesterolemia pode reduzir a produção de NO através da alteração deste equilíbrio regulatório. É provável que a modulação de abundante caveolina nas células endoteliais, participe na patogênese da disfunção endotelial e efeitos pró-aterogênicos da hipercolesterolemia.

Este estudo sugere que os alelos mutantes para o polimorfismo T-786C favorecem o acúmulo do colesterol total, pois a frequência agrupada dos alelos C e A nos genótipos TA, TC, CC e CA foi de 76,0% em pacientes que têm o colesterol elevado (>200 mg/dl), enquanto que em pacientes que possuem o colesterol <200 mg/dl, esta frequência diminui para 47,0% (P<0,05). Assim, fica evidente a contribuição destes genótipos para o

aumento do colesterol total nos pacientes (controle + IAM/HAS). Pacientes com pelo menos um alelo desfavorável (C ou A) têm um risco relativo aumentado de 4,8 (IC 95% 1,7608-12,9639) em ter colesterol total >200mg/dl, provavelmente por reduzir a síntese do eNOS, como acontece com o alelo C sugerido por Nakayama *et al.* (1999).

Hibi *et al.* (1998) executaram estudos no loco do eNOS e acharam uma significativa associação entre os homozigotos mutantes para o polimorfismo Glu298Asp e a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM). Embora Bonnardeaux *et al.* (1995) não tenha relatado nenhuma associação entre o gene eNOS e a HAS, uma recente investigação feita por Wang *et al.* (1996) sugeriu que o gene do eNOS está relacionado com a doença arterial coronária (DAC). No presente estudo não revelou nenhuma associação do alelo T da variante Glu298Asp com a ocorrência de IAM e HAS.

Similarmente ao polimorfismo T-786C, os variantes do Glu298Asp também têm efeito no acúmulo de colesterol total. A frequência agrupada do alelo T nos genótipos GT e TT foi de 90,0% em pacientes que têm o colesterol elevado (> 200 mg/dl), enquanto que em pacientes que possuem o colesterol < 200 mg/dl, esta frequência diminui para 50,0% (P<0,05). Assim, fica evidente a contribuição destes genótipos para o aumento do colesterol total nos pacientes (controle + IAM/HAS). Pacientes com pelo menos um alelo desfavorável (T) têm um risco relativo aumentado de 3,6 (IC 95% 1,3982-9,0770) em ter colesterol total >200mg/dl.

Dos fatores de risco cardiovascular classicamente comprovados na literatura, apenas os altos níveis de colesterol total e LDL, e os baixos níveis de HDL apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (P=0,011, P=0,002 e P=0,004 respectivamente). Talvez isso explicaria parcialmente, o

acometimento desses pacientes pelo IAM e HAS.

Devido a pequena amostragem, outros estudos serão necessários para confirmar a interação entre os polimorfismos gênicos do eNOS com o IAM/HAS.

### **Agradecimentos**

Grupo de Cardiologia do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, e ao órgão de fomento à pesquisa, FAPEMIG.

## Referências bibliográficas\*

- Bassam BJ, Cactano-Anolles G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196:80-83.
- Blum H, Beir H and Gross HJ (1987) Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Bonmardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F (1995) Lack of evidence for the endothelial cell nitric synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 91:96-102.
- Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias(II): detecção, avaliação e tratamento (1996) *Arquivos Brasileiros de cardiologia* 67:1-16
- Cooke JP and Dzau VJ (1997) Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu. Ver. Med.* 48:489-509
- Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL (1999) Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 103:897-905.
- Fleming I and Busse R (1999) NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31:5-14.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T *et al.* (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 32:521-526
- Rang HP, Dale MM (1993) *Farmacologia*. In: Óxido nítrico. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro pp 156-163.
- Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C *et al.* (2002) The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 39:919-922
- Janssens SP, Shimouchi A, Queternous T, Bloch DB, Block KD (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267:14519-14522.
- Konturek SK and Konturek PC (1995) Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion* 56:1-13.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM *et al.* (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268:17478-17488.
- Maruya E, Saji H and Fujita T (1996) High – throughput assymetric – PCR SSCP analysis using – controlled temperature conditions. *Biotechniques* 21:710-716.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M *et al.* (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.
- Moncada S (1992) The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145:201-227.
- Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 329:2002-2012.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H *et al.* (1999) T786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.
- Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC (1999) Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ. Res.* 85:29-37.
- Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, Braniff BA, Brooks NH, Califf RM (1996) ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *J. Am. Coll. Cardiol.* 28: 1328-428.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratorial manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor Press, New York, v.1.
- Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H *et al.* (1998) Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31:1506-1510.
- Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H and Yasujima M (2000) Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hipertension in northem. *Japan Life Sci.* 66:2557-2562.
- Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM and Wilcken DE (1996) A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat. Med.* 2:41-45.
- Wang Y and Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv. Pharmacol.* 34:71-90.
- WHO (1979) Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease (report of the joint internatiol society and federation of cardiology/World Health

Organization task force on standardization of clinical nomenclature). *Circulation* 59: 607-9.

Yasue H, Yoshimura M, Sugiyama S, Sumida H, Okumura K, Ogawa H *et al.* (1995) Association of a point mutation of the endothelial cell nitric oxide synthase (eNOS) gene with coronary spasm. *Circulation* 92:1-363.

**\*De acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Biology***

- [Scope and policy](#)
- [Submission of papers](#)

Print ISSN 1415-4757

### Scope and policy

**Genetics and Molecular Biology** (former the [Brazilian Journal of Genetics](#) - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the [Sociedade Brasileira de Genética](#) (Brazilian Society of Genetics).

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

No page charges are applied. For each paper 50 reprints will be supplied. No additional copies can be supplied.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

### Submission of papers

#### 1. Manuscripts should be submitted to:

Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief  
**Genetics and Molecular Biology**  
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736  
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

#### 2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a. A cover letter including statements that all authors approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or is not under

- consideration for publication elsewhere;
- b. Three copies of the manuscript and figures.
  - c. Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
  - d. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF. In windows platform. Images in GIF., TIFF., JPEG., Corel Draw or Excell formats should be sent in separate files Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution. Manuscripts may be returned before being reviewed.

### **3. Categories of Contribution**

#### **3.1. Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

**a) The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names; the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author alterations charges.

**b) The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

**c) The text** must be as succinct as possible. *Text*



*citations*: citations with two authors must include both names. In citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. When citing personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). *Numbers*: In the text numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics.

The text includes the following elements:

*Introduction* – Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

**d) The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) The References Section:** citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; all authors up to the first six should be listed, followed by "et al" for seven or more; journal titles must be abbreviated according to Medline (link=  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>);

references should be referred to in the text by authors'

**f) Figures** must be numbered consecutively in Arabic